

Antimikrobielle Hemmstoffe
bei
Proteus rettgeri

vorgelegt von
Gabriele Cammisar
Speyer 1977

1979

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und
medizinische Mikrobiologie der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Hermann Eyer

Antimikrobielle Hemmstoffe

bei

Proteus rettgeri

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gabriele Cammisar

aus

Speyer

1977



1. Berichterstatter : Prof. Dr. A. Bauernfeind

2. Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 1979

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Gliederung

I. Einleitung

II. Material und Methodik

1. Material

1.1. Bakterienstämme

1.2. Medien und weiteres Untersuchungsmaterial

1.2.1. Nährmedien

1.2.2. Differenzierungsmedien

1.2.3. Weiteres Untersuchungsmaterial

2. Methoden

2.1. Klassifizierung nach biochemischen Leistungen

2.2. Resistenzbestimmung

2.2.1. Im Agardiffusionstest

2.2.2. Im Agarincorporationstest

2.2.3. Im Reihenverdünnungstest

2.3. Nachweis von Hemmsubstanzen

2.4. Verfahren zur Charakterisierung der Hemmsubstanzen

2.4.1. Diffusion

2.4.2. Trypsinempfindlichkeit

2.4.3. Filterdurchgängigkeit

III. Ergebnisse

1. Analyse des Stammmaterials

1.1. Biochemische Differenzierung

1.2. Resistenzverhalten

1.2.1. Im Agardiffusionstest

1.2.2. Im Agarincorporationstest

1.2.3. Im Reihenverdünnungstest

2. Auftreten von Hemmsubstanzen

2.1. Hemmstoffproduzierende Stämme

2.2. Hemmstoffsensitive Stämme

3. Charakterisierung der Hemmsubstanzen

3.1. Synthesebedingungen

3.2. Hemmspektren

- 3.2.1. Denver-Stämme
- 3.2.2. Essen-Stämme
- 3.2.3. Hongkong-Stämme
- 3.3. Diffusionsfähigkeit
 - 3.3.1. Denver-Stämme
 - 3.3.2. Essen-Stämme
 - 3.3.3. Hongkong-Stämme
- 3.4. Trypsinempfindlichkeit
- 3.5. Filterdurchgängigkeit

IV) Diskussion

- 1. Häufigkeit und Synthesebedingungen bakteriozino-
gener Stämme
- 2. Klassifizierung der Hemmsubstanzen
 - 2.1. Nach Hemmspektren
 - 2.2. Nach Diffusion
 - 2.3. Nach Trypsinempfindlichkeit
 - 2.4. Nach Filterdurchgängigkeit
 - 2.5. Mit Hilfe aller Kriterien

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. EINLEITUNG

Bakteriozine sind antibiotische Substanzen, die von Bakterien produziert werden. Von klassischen Antibiotika unterscheiden sie sich u.a. dadurch, daß ihre abtötende Wirkung auf Stämme gleicher oder eng verwandter Arten beschränkt ist (7,8,12,14). Sie besitzen Proteincharakter und weisen ein spezifisches Stammwirkungsspektrum auf. Um wirken zu können benötigen sie die Adsorption an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der sensiblen Bakterienzelle (6,14).

In einer vorangegangenen Arbeit war es gelungen, bei einer Reihe von Stämmen der Spezies *Fr. rettgeri* Bakteriozin nachzuweisen (13). Es wurde versucht, anhand der Bakteriozinogenie ein Klassifizierungsschema zu erarbeiten (13). Die geringe Zahl der zur Verfügung stehenden hemmstoffsynthetisierenden (Producer) bzw. hemmstoffsensitiven (Indikatoren) Stämme, ließ jedoch eine für die epidemiologische Praxis befriedigende Typisierung noch nicht zu. Für diesen Zweck ist es daher dringend erforderlich, die Zahl bakteriozinogener sowie bakteriozinsensitiver Stämme zu vergrößern.

Bakteriozinsynthese konnte von uns bisher erst *n a c h* Induktion mit Mitomycin nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu der Situation bei *Pseudomonas aeruginosa*. Dort ist Spontansynthese die Regel (10).

Ferner konnten wir bisher bei *Fr. rettgeri* ausschließlich in Agar *n i c h t* diffundierende, d.h. hochmolekulare, partikuläre Hemmstoffe nachweisen.

Bei der Suche nach weiteren Producern und Hemmstofftypen gingen wir von der Vorstellung aus, daß in einem begrenzten Einzugsbereich das Risiko, ähnliche oder identische Stämme zu finden, größer ist, als bei Ausdehnung der Suche auf Isolierungen aus geographisch auseinanderliegenden Bereichen. Deshalb erstreckte sich die vorliegende Untersuchung auf Isolierungen aus DENVER, ESSEN und BERGKOLG.

Aufgabe dieser Arbeit ist

1. das Auffinden weiterer für die Bakteriozintypie der Spezies *Proteus rettgeri* geeigneter Producer und Indikatoren
2. die Beantwortung der Frage, ob neben p a r t i k u - l ä r e n (bacteriocin-like) Hemmstoffen in dieser Spezies auch n i e d e r m o l e k u l a r e (colicin-like) Hemmsubstanzen auftreten.

II. MATERIAL und METHODIK

1. Material

1.1. Bakterienstämme

Zur Verfügung standen uns 123 Stämme von *Proteus rettgeri*, die in Denver, Essen und Hongkong isoliert worden waren.

DENVER

Herkunft: Dr. Deinhardt, Dr. Ianinni,
Veterans Administration Hospital,
Denver, Colorado.

49 Stämme, hiervon 5 in a und b
unterteilt: D 2a, D 2b, D 8a, D 8b,
D 15a, D 15b, D 26a, D 26b, D 40a, D 40b.

ESSEN

Herkunft: Dr. Linzenmeier, Institut für Mediz.
Mikrobiologie, Robert Koch-Haus,
Klinikum Essen.

20 Stämme

HONGKONG

Herkunft: Dr. Huang, Queen Elisabeth Hospital,
Hongkong.

35 Stämme, Unterteilung eines Stam-
mes in H 27a und H 27b.

JAPAN

Herkunft: Dr. Namioka, National Institute of
Animal Health, Tokyo.

9 Stämme

MÜNCHEN

Herkunft: Aus dem Münchener Klinikbereich im
Max von Pettenkofer-Institut (1)
isolierte Stämme (4 Stämme).

1.2. Medien und weiteres Untersuchungsmaterial

1.2.1. Nährmedien

MUELLER - HINTON - AGAR (Difco)

Mueller - Hinton Broth	16,8 g
Bacto - Agar	12,0 g
Aqua deion.	ad 800,0 ml

TRYPTONE SOYA BROTH (Oxoid)

TSB	30,0 g
Aqua deion.	ad 1000,0 ml

1.2.2. Differenzierungsmedien

Zur Kontrolle der uns als Pr. rettgeri überlassenen Stämme wurden einzelne bakterielle Stoffwechselaktivitäten und Eigenschaften herangezogen. Wir benutzten dazu folgende Differenzierungsmedien üblicher Zusammensetzung:

Urease (Harnstoffspaltung),
Tryptophan (Indolbildung) ,
Citrat (Abbau),
Ornithin (oxidative Decarboxylierung) ,
Voges-Proskauer (Acetoin synthese) ,
Gelatine (Verflüssigung) ,
Beweglichkeit (37°C sowie Zimmertemperatur),
SIM-Agar (Indol-, H₂S-Bildung, Beweglichkeit),
Fermentation von Kohlenhydraten:
Glukose, Laktose, Maltose, Adonit, Inosit,
Mannit.

1.2.3. Weiteres Untersuchungsmaterial

MITOMYCIN C for Injection, Kyowa Hakko,
Kogyo Co. LTD, Tokio.

TRYPSIN aus Rinderpankreas, lyophil., salzfrei,
Fremdaktivität 0,5% Chymotrypsin
(SERVA, Heidelberg).

CELLULOSE-ACETAT-FILTER

Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 μ m
(SARTORIUS-Membranfilter GMBH, Göttingen).

2. Methoden

2.1. Klassifizierung nach biochemischen Leistungen

Die Stämme werden in MH-Bouillon eingepflegt, bei 37°C inkubiert und bei Erreichen der optischen Dichte 0,4 (gemessen im Bockman Model C Colorimeter) für diese Untersuchungen verwendet. Für die Reaktionen werden positive und negative Kontrollstämmе mitgeführt.

2.2. Resistenzbestimmung

2.2.1. Im Agar diffusions test

3 ml Softagar (0,7%) werden mit 0,1 ml der entsprechenden Bakteriensuspension mit einer optischen Dichte von 0,3 gemischt und auf Platten mit 20 ml MH-Agar als Grundschrift gegossen. Antibiotika werden in Blättchen bzw. Sternen auf den Produccerrassen aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle 123 Fr. rettgeri Stämme wurden geprüft gegen :

Novobiocin (NOVO)	30 mcg
Tetracyclin (TET)	20 mcg
Chloramphenicol (CML)	10 mcg
Polymyxin (POLY)	40 mcg
Nalidixinsäure (NX)	30 mcg
Sulfanilamid (SID)	800 mcg
Baktrim (BAKT)	25 mcg
Nitrofurantoin (NITRO)	100 mcg
Streptomycin (STR)	5 mcg
Neo-/Kanamycin (NEO/KANA)	20 mcg
Gentamycin (GENTA)	30 mcg
Anabactyl (ANA)	100 mcg
Ampicillin (AMPI)	15 mcg
Cephalothin (CEPH)	20 mcg

2.2.2. Im Agar i n c o r p o r a t i o n s t e s t
(Mitomycinempfindlichkeit)

Die Bestimmung der Mitomycinkonzentration erfolgte entsprechend den Angaben einer vorangegangenen Arbeit (13).

Auf Mueller-Hinton-Medium unterschiedlicher Mitomycinkonzentrationen wurden jeweils 13 Stämme einer OD 0,025 auf 5 mm Strichlänge mit einer Platinoese ausgestrichen und dann 16 Stunden bei 32°C inkubiert. Wachstumsabstufungen lieferten uns Angaben über tolerierte Mitomycinkonzentrationen.

2.2.3. Im Reihen v e r d ü n n u n g s t e s t
(MHK-Werte)

Die Antibiotikumkonzentration, bei welcher gerade kein Wachstum mehr erfolgte, wurde durch Extinktionsmessung bei 660 nm bestimmt.

Die zu prüfenden Stämme läßt man nach Einimpfen in MH-Bouillon auf OD 1,0 wachsen, verdünnt anschließend mit gleichem Medium auf OD etwa 0,1 und inkubiert nochmals 2 Stunden, um logarithmisches Wachstum zu gewährleisten. Eine Konzentrationsreihe des Antibiotikums in 4 ml MH-Bouillon mit einer Kolonienbilnerzahl von 10^6 /ml wird 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

2.3. Nachweis von Hemmsubstanzen (4)

Stämme, die wir auf Hemmstoffsynthese hin untersuchten, wurden am Vorabend in je 4 ml TSB eingepflegt und bei 37°C inkubiert. Von diesen Vorkulturen überführt man am nächsten Tag etwa einen ml in 4 ml frische TSB und bebrütet erneut mehrere Stunden. Dann wird auf eine OD von 0,375 eingestellt. Jeweils 2 Oesen (1 Oese faßt 0,01 ml) der Bakteriensuspension werden nun gleichmäßig auf Schalen mit Mueller-Hinton-Agar innerhalb einer zentralen Kreisfläche mit 50 mm Durchmesser verteilt. Anschließend wird 16 Stunden bei 32°C inkubiert. Nach Entfernen des Producer-rasens wird zum Abtöten verbliebener Bakterien mit Chloroform behandelt.

Indikatorstämme werden wie die Producer in TSB vor-kultiviert, die OD wird dann jedoch auf 0,025 ein-gestellt. Mit der Kurzkannte eines rechteckigen Fla-tinspatels werden nun pro Platte 8 Indikatoren nach folgendem Muster ausgestrichen:

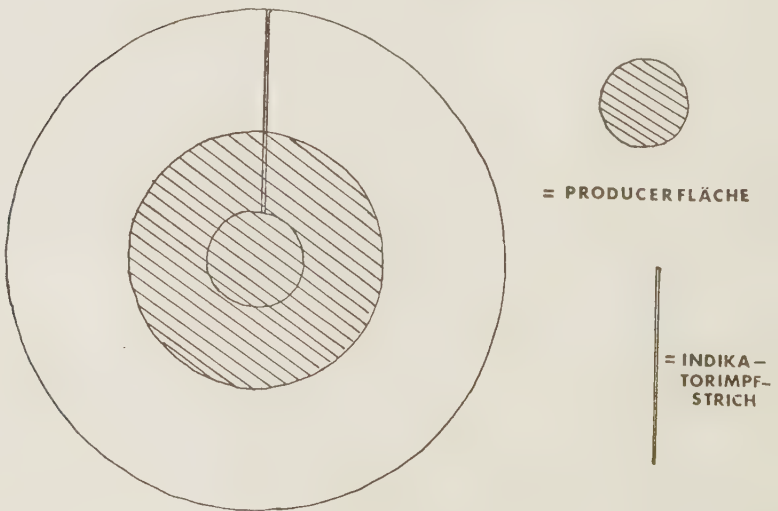
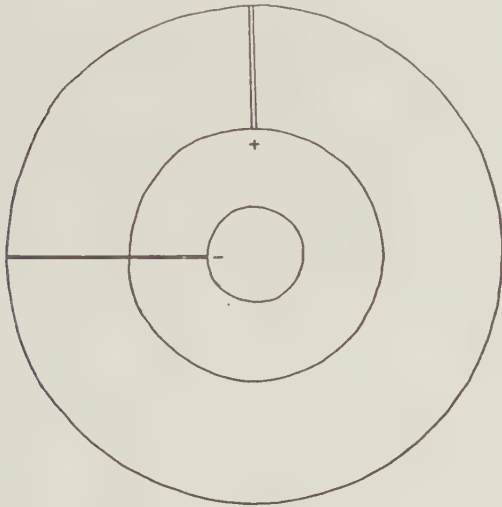


Abb. 2 : Beurteilung der Hemmsubstanzsynthese



Nach Aufbringen der Indikatorstämme bebrütet man über Nacht bei 37°C. Die Beurteilung von Hemmeffekten wurde nach folgendem Schema ausgeführt:

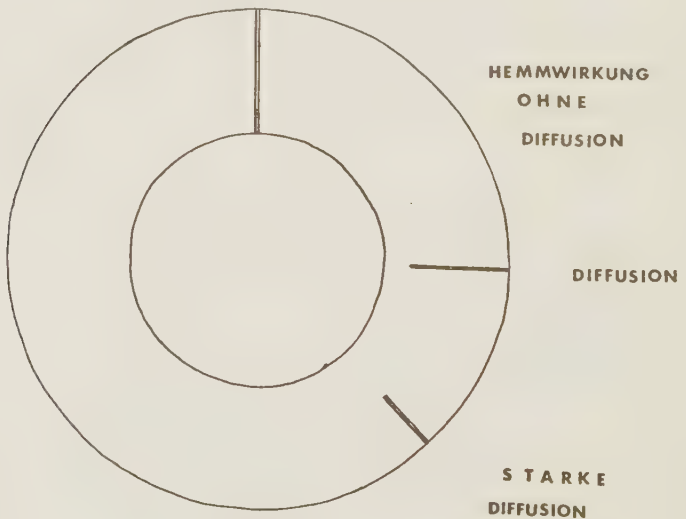
- a) durchgehendes Wachstum, d.h. Wachstum über die volle ausgestrichene Strichlänge : n e g a t i v
- b) geringe Abschwächung : -/+
- c) innerhalb der Kreisfläche noch Wachstum, gemessen an dem in der Außenzone jedoch deutlich abgeschwächt: +/-
- d) völlige Hemmung des Indikatorstrichs : p o s i t i v.

2.4. Verfahren zur Charakterisierung der Hemmsubstanzen

2.4.1. D i f f u s i o n

Hinweise auf Diffusion der Hemmstoffe liefert die Ausstreichmethode. Bei nicht diffusiblen Hemmsubstanzen kann sich eine Hemmwirkung nur bis zum äußeren Rand der Producerzone ausdehnen. Diffundierende Bakteriozine hingegen, wirken auch außerhalb der zentralen Kreisfläche hemmend. Dies sieht folgendermaßen aus :

Abb. 3 : Differenzierung zwischen partikulären und diffundierenden Hemmsubstanzen



2.4.2. T r y p s i n empfindlichkeit

Trypsin wird in sterilem Phosphatpuffer (pH6,8) gelöst, geeignete Mengen hiervon in leere Petrischalen pipettiert. Das Enzym wird nach Abkühlen des Mediums auf etwa 50°C zugegeben und dann durch leichtes Schwenken der Schalen gleichmäßig im Medium verteilt. Nach Erstarren des Mediums werden nacheinander der Producer und die Indikatoren wie oben beschrieben aufgebracht.

2.4.3. F i l t e r durchgängigkeit

Auf NH-Agar geeigneter Mitomycinkonzentrationen wird ein Cellulose-Acetat-Filter auf die Mediumoberfläche aufgelegt. Darauf werden die Producer in üblicher Dichte, unter Freilassen einer schmalen Randzone, ausgestrichen und 16 Stunden bei 32°C inkubiert.

Das Entfernen des Filters erfolgt nun mit Hilfe von Oese und Pinzette. Anschließend wird wie unter 2.3. beschrieben mit Chloroform behandelt, schließlich Indikatorstämme ausgestrichen und 17 Stunden bei 37°C bebrütet.

III. ERGEBNISSE

1. Analyse des Stammmaterials

1.1. Biochemische Differenzierung

Die uns zugesandten 123 Fr. rettgeri Stämme wurden nach differentialdiagnostisch relevanten Stoffwechselleistungen analysiert (9).

Tab. 1 : Stoffwechselaktivitäten der DENVER-, ESSEN- und HONGKONG- Stämme

	DENVER	ESSEN	HONGKONG
Urease	98% +	100% +	100% +
Indol	90% +	100% +	100% +
Citrat	98% +	100% +	100% +
Beweglichkeit (bei 20°C)	45% +	70% +	89% +
Mannit	40% +	100% +	100% +
Adonit	4% +	100% +	100% +
Inosit	100% +	100% +	100% +
Glucose	100% +	100% +	100% +
Lactose	100% -	100% -	100% -
Maltose	100% -	100% -	100% -
H ₂ S	100% -	100% -	100% -
Voges-Proskauer	100% -	100% -	100% -
Ornithin	100% -	100% -	100% -
Gelatine	100% -	100% -	100% -

Demnach stimmten die Stämme aus Essen und Hongkong in ihren Stoffwechselleistungen fast völlig überein (Abweichung lediglich im Anteil der beweglichen Stämme). Deutlich abgesetzt davon waren die im Denver-Einzugsbereich isolierten Stämme.

K e i n e C i t r a t v e r w e r t u n g : D 29

K e i n e I n d o l b i l d u n g : D 2a, D 2b, D 9, D 32, D 36.

K e i n e H a r n s t o f f s p a l t u n g : D 43.

K e i n e B e w e g l i c h k e i t :

D 2a, D 2b, D 5, D 6, D 8a, D 8b, D 9, D 13, D 17, D 18, D 21, D 24, D 25, D 26a, D 26b, D 27, D 30, D 31, D 33, D 35, D 36, D 37, D 38, D 39, D 40a, D 40b, D 43.

E 7, E 10, E 11, E 14, E 16, E 17.

H 6, H 11, H 17, H 31.

K e i n e F e r m e n t a t i o n v o n M a n n i t :

D 1, D 3, D 4, D 6, D 7, D 10, D 11, D 12, D 14, D 15a, D 15b, D 16, D 19, D 20, D 21, D 22, D 23, D 24, D 25, D 26a, D 26b, D 27, D 28, D 30, D 32, D 35, D 41, D 42, D 43.

1.2. Resistenzverhalten

1.2.1. Im Agar diffusions test

Tab. 2: Gruppierung der Stämme nach Resistenzmustern

Chemotherapie (vgl. Material und Methodik)
(1 = sensitiv; 2 = resistent)

Stämme	NOVO	TET	CML	POLY	NX	SID	BAKT	NITRO	STR	NEO/KANA	GENTA	ANA	AMPI	CEPH
D: 32	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
E: 1,17.														
H: 2,4,6,7,9,10,12, 13,14,15,16,21,23.														
D: 17,26a,26b,27,30, 33,35,36,37,39, 40a,40b.	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D: 7,10,11,14,16,42.	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2
H: 26														

Stämme	NOVO TET CML POLY NX SID BAKT NITRO STR NEO/KANA GENTA ANA AMPI CEPH														
D: 2a,2b,8a,8b,9,13.	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
D: 3,4,12,20.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
H: 32,33.															
D: 21	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2
E: 2,3,15,19.															
E: 6	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2
H: 1,5,8															
D: 19,22,23.	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2
H: 17															
H: 19,22,24.	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2
D: 25	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2
E: 8,9.															
E: 11,16.	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
H: 25.															
D: 1,5,31.	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
D: 28.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
E: 18.															

Stämme	NOVO TET CML POLY NX SID BAKT NITRO STR NEO/KANA GENTA ANA AMPI CEPH													
H: 27a,27b.	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2
D: 43.	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
H: 20.														
D: 6	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
D: 15a	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2
D: 15b	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1
D: 18	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1
D: 24	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2
D: 29	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
D: 34	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2
D: 38	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2
D: 41	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2
E: 4	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
E: 5	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2
E: 7	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	2

Stämme	NOVO TET CML POLY NX SID BAKT NITRO STR NEO/KANA GENTA ANA AMPI CEPH													
E: 10	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
E: 12	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2
E: 13	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2
E: 14	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2
E: 20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
H: 3	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
H: 11	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2
H: 18	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2
H: 28	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
H: 29	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
H: 30	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2
H: 31	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
H: 34	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2

1.2.2. Im Agar i n c o r p o r a t i o n s t e s t

Bestimmt werden sollte hier die Mitomycinempfindlichkeit der Stämme, um Anhaltspunkte für mögliche Induktionskonzentrationen zu erhalten. Bei einer Mitomycinkonzentration von 0,25_{mcg}/ml verhielten sich die Denver-, Essen- und Hongkong-Stämme folgendermaßen:

Tab. 3 : Mitomycinresistenz der Teststämme

resistent	D: 1,3,4,5,7,8a,9,10,11,12,13, 14,15a,15b,16,17,19,20,22, 27,28,29,30,31,33,34,35,36, 37,38,42,43. E: 3,4,6,8,9,12,18. H: 1,3,8,9,10,16,27a,27b,28,29,34.
mäßig re- sistent	D: 2a,2b,6,8b,18,21,23,24,25,26a, 26b,32,39,40a,40b,41. E: 2,7,10,13,15,19,20. H: 2,4,5,6,12,14,15,19,25,26.
sensitiv	D: - E: 1,5,11,14,16,17. H: 7,11,13,17,18,20,21,22,23, 24,30,31,32,33.

Auf Grund der Resultate entschlossen wir uns, für die folgenden Untersuchungen pro Teststamm jeweils drei Medien mit 0/0,1/0,25_{mcg} Mitomycin einzusetzen.

1.2.3. Im Reihen verdünnungstest

Tab. 4 : MHK - Werte von D 24 und D 25 bei Anwendung von CARBENICILLIN

	Carbenicillin (mcg/ml)										
	0	0,01	0,1	1,0	10	50	100	1000	5000	10.000	50.000
D 25	155					155	145	145	90	0	0
D 24	165	150	150	80	0	0	0				
A 15*	310			290	280	280	280	270	240	120	0

Das Wachstum von D25 wird bei einer Carbenicillinkonzentration von 10.000 mcg gehemmt, das von D 24 bereits bei 10 mcg.

2. Auftreten von Hemmsubstanzen

2.1. Hemmstoffproduzierende Stämme

Über keinen der zu untersuchenden *Fr. rettgeri* - Stämme lagen Anhaltspunkte für die Möglichkeit einer Hemmstoffsynthese vor.

Um Bakteriozinogenie feststellen und beurteilen zu können, gingen wir mit einer von uns ausgearbeiteten Methode (4) vor.

Unter den 123 uns vorliegenden *Fr. rettgeri* - Isolierungen gelang uns auf diesem Wege der Nachweis von Wachstumshemmsubstanzen bei folgenden Stämmen :

DENVER-Stämme :

Von 48 Stämmen waren 40 (=83,3%) zur Bakteriozinbildung befähigt :

D: 1,2a,2b,3,4,6,7,8b,10,11,12,14,15a,15b,16,
17,19,20,21,22,23,24,25,26a,26b,27,28,29,
30,31,32,33,34,35,37,39,40b,41,42,43.

ESSEN-Stämme :

Drei von 20 Stämmen (=15%) synthetisierten eine Hemmsubstanz :

E: 7,12,18.

HONGKONG-Stämme :

Bakteriozinogenie war bei 4 von 35 Stämmen (=11,4%) nachweisbar :

H: 9,24,27a,27b.

2.2. Hemmstoffsensitive Stämme

Zu Beginn des Screeningverfahrens konnte eine Reihe von Stämmen eingesetzt werden, die in einer vorangegangenen Arbeit (13) bereits untersucht und als Indikatoren identifiziert worden waren. Hierbei handelte es sich um Stämme folgender Herkunft:

München: M 11, M 116, M 199, M 200 (s.1.1.).

Japan : J 9, J 10, J 36, J 38, J 52, J 55, J 56, J 67,
J 87 (s.1.1.).

Da Anhaltspunkte dafür, ob sich ein Stamm als Indikator eignet oder nicht, fehlen, wurden nun beliebig Stämme aus der Denver-, Essen- und Hongkong-Gruppe herausgegriffen und als mögliche Indikatoren eingesetzt; es waren:

D 34, D 35, D 36, D 37, D 38, D 39, D 40a, D 40b, D 41, D 42,
D 43.

Unter diesen 11 neuen potentiellen Indikatoren, erwiesen sich 8 als tatsächliche.

Lediglich D 41, D 42 und D 43 zeigten keine Wirkung gegenüber den hier gefundenen Hemmstoffen. Dies gilt auch für M 200 und J 36, Stämme, welche früher beschriebenen Bakteriozinen gegenüber (13) sensitiv waren. Von welchen bakteriozinogenen Stämmen die 19 insgesamt sensitiven Stämme im einzelnen gehemmt wurden, geht aus der folgenden Übersicht hervor:

Tab. 5 : Sensitivitätsspektren der 19 Indikatoren

Indikatoren	sensitiv gegen:
M 11	D: 1,2b,15a,15b,17,26a,26b, 27,28,30,31,35,37,39. E: 12.
M 116	D: 1,2a,2b,15a,15b,17,26a, 26b,30,31,33. E: 12.
M 199	H: 27a,27b. E: 12.
J 9	D: 6,15a,15b,21,24,25,28, 32,41. E: 7,12. H: 9,24.
J 10	D: 15a,15b,26a. E: 12. H: 27b.
J 38	D: 3,4,7,10,11,12,14,16,19, 20,22,23,34,42. E: 12,18. H: 27b.
J 52,J 55	E: 12. H: 27b.
J 56	D: 15a,15b,43. E: 12.
J 67	H: 27b.
J 87	D: 15a,15b,28,29. E: 12. H: 27b.
D 40b	D: 3,4,7,10,11,12,14,16,19, 20,22,23,34,42,43. E: 12.
D 40a	D: 10,14,20. E: 12.
D 36,D 39	D: 40b

Indikatoren	sensitiv gegen:
D 38	D: 8b,40b. E: 12,18.
D 37	D: 8b,40b. E: 12.
D 35	E: 12.
D 34	D: 15a,15b. H: 27b.

Lediglich die Indikatorstämme J 52 und J 55 sowie D 36 und D 39 stimmen demnach in ihrer Sensitivität überein. Am häufigsten empfindlich reagiert J 38 (17 mal), wobei eine in 15 Fällen gleichzeitig gekoppelte Hemmung von D 40b - und zwar überwiegend spontan - zu beobachten ist.

Doppelfunktion als Indikatoren und Producer fand sich bei D 34, D 35, D 37, D 39 und D 40b; sensitiv waren sie freilich nur gegenüber Bakteriozinen anderer Stämme und nicht gegenüber dem von ihnen selbst synthetisierten.

Demnach kann die getroffene Auswahl von Stämmen als mögliche Indikatoren als günstig bezeichnet werden : mit 19/24 (=79,2%) bei nur zweimal identischen Spektren (J 52/J 55 bzw. D 36/D 39) ermöglichte sie eine gute Differenzierung der Hemmstoffe.

3. Charakterisierung der Hemmsubstanzen

3.1. Synthesebedingungen

Bakteriozinsynthese erfolgte bei den einzelnen Producern unter verschiedenen Bedingungen. Ein Teil der Stämme entfaltete seine volle Hemmwirkung auf das Indikatorwachstum bereits ohne Zusatz des induzierend wirkenden Mito-mycins.

Bei den übrigen Producerstämmen hingegen, konnte erst unter Induktion Hemmsubstanz nachgewiesen werden.

Tab. 6 : Bakteriozinbildung der DENVER-, ESSEN- und HONGKONG-Stämme

SPONTAN	nur bei INDUKTION
D: 3,4,6,7,10,11,12,14, 15a,15b,16,19,20,22, 23,25,28,42,43.	D: 1,2a,2b,8b,17,21,24, 26a,26b,27,29,30,31, 32,33,34,35,37,39, 40b,41.
E: 12	E: 7,18.
H: 27a,27b.	H: 9,24.

3.2. Hemmspektren

3.2.1. DENVER-Stämme

Ein großer Teil der 19 Spontanproducer (10/19 = 52,6%) stimmt im Indikatorspektrum voll überein. So hemmen alle folgenden Producer die Indikatoren J 38 und D 40b:

D 3, D 4, D 7, D 11, D 12, D 16, D 19, D 22, D 23, D 42.

Vier spontanhemmende Stämme können ihr Spektrum unter Induktion durch Mitomycin C erweitern: D 10, D 14, und D 20 um den Indikator D 40a; D 28 um die Indikatoren M 11 und J 9.

Tab. 7 : Hemmungsmuster der DENVER-Stämme

Producer-Typ	sensitive Stämme
1. D: 27,35,37,39	M 11
2. D: 2a,33	M 116
3. D: 6,21,24,25,32	J 9
4. D: 29	J 87
5. D: 1,2b,17,26b,30,31	M 11, M 116
6. D: 41	J 9, J 56
7. D: 43	J 56, D 40b
8. D: 3,4,7,11,12,16,19, 22,23,34,42	J 38, D 40b
9. D: 8b	D 37, D 38
10. D: 10,14,20	J 38, D 40a, D 40b
11. D: 26a	J 10, M 11, M 116
12. D: 28	J 9, J 87, M 11
13. D: 40b	D 36, D 37, D 38, D 39
14. D: 15a, 15b	J 9, J 10, J 56, J 87, M 11, M 116, D 34

3.2.2. ESSEN-Stämme

Bei drei der insgesamt 20 Stämme (15%), nämlich E 7, E 12 und E 18, konnte Bakteriozinsynthese nachgewiesen werden:

Tab. 8 : Hemmungsmuster der ESSEN-Stämme

Mitomycin (mcg./ml)

Producer	0	0,1	0,25	sensitive Stämme
E 7	-	-	+/-	J 9
E 18	-	-	+	J 38, D 38
E 12	+	+	+	J 9, J 10, J 38, J 87, M 11, M 116, M 199, D 37
	-	+	+	J 52, J 55, J 56, D 40a, D 40b, D 38
	-	-	+/-	D 35

Die Hemmstoffe dieser drei Producer zeigten in ihrem Wirkungsspektrum *keine* Übereinstimmung; es liegen also drei verschiedene Producertypen vor.

E 12 nahm insofern eine Sonderstellung ein, als dieser Stamm, mit einem 15 Indikatoren umfassenden Aktivitätsspektrum, die am breitesten gefächerte Wirkung aller Essen-Stämme besitzt.

3.2.3. HONGKONG-Stämme

Ebenso wie bei den Stämmen aus Essen kann hier, gemessen an dem Verhalten der Denver-Stämme, nur ein geringer Prozentsatz ($4/35 = 11,4\%$) als Producer identifiziert werden:

Tab. 9 : Hemmungsmuster der HONGKONG-Stämme

Mitomycin (mcg/ml)

Producer	0	0,1	0,25	sensitive Stämme
H 9	-	-	+/-	J 9
H 24	-	+/-	+/-	J 9
H 27a	+	+	+	M 199
H 27b	+	+	+	J 10, J 38, J 52, J 55, J 67, J 87, M 199, D 34

In dieser Stammgruppe ließen sich also anhand der Bakteriozinogenie drei Typen voneinander abgrenzen. H 9 und H 24 sind im Spektrum identisch, sie hemmen beide J 9.

Der dritte bakteriozinsynthetisierende Stamm, H 27b, zeichnet sich aus durch ein breites Spektrum mit 8 Indikatoren, die bereits ohne Induktion vollständig im Wachstum gehemmt werden.

Bei H 27a konnte nur ein einziger sensibler Stamm, - M 199 - gefunden werden.

Einen Überblick der Producententypen aus den drei Isolierungsbereichen, nach Hemmspektren eingeteilt, gibt die folgende Tabelle:

Tab. 10 : Klassifizierung der Hemmstoffe nach Indikatorspektren

Producer	sensitive Stämme
D: 6,21,24,25,32 E: 7 H: 9,24	J 9
D: 2a,33	M 116
D: 27,35,37,39	M 11
D: 29	J 87
H: 27a	M 199
D: 3,4,7,11,12,16,19,22, 23,34,42	J 38,D 40b
E: 18	J 38,D 38
D: 1,2b,17,25b,30,31	M 11,M 116
D: 43	J 56,D 40b
D: 8b	D 37,D 38
D: 41	J 9,J 56
D: 28	J 9,J 87,M 11
D: 26a	J 10,M 11,M 116
D: 10,14,20	J38,D 40a,D 40b
D: 40b	D 36,D 37,D 38,D 39
D: 15a,15b	J 9,J 10,J 56,J 87, M 11,M 116,D 34
H: 27b	J 10,J 38,J 52,J 55, J 67,J 87,M 199,D 34
E: 12	J 9,J 10,J 38,J 52,J 55, J 56,J 87,D 35,D 37,D 38, D 40a,D 40b,M 11,M 116,M 199

3.3. Diffusionsfähigkeit

Einige Stämme, nachfolgend aufgeführt, synthetisierten Hemmsubstanzen, die im festen Nährmedium aus dem Bereich vorangegangenen Producerwachstums hinausdiffundierten:

3.3.1. DENVER-Stämme

Diffundierende Substanzen dieser Producer hemmten folgende Stämme:

Tab. 11: Hemmspektrum diffundierender Bakteriozine
der Denvergruppe

sensitive Stämme	Producer
J 38	D: 3,4,7,11,12,14,16,19, 20,23.
J 38,D 40b	D: 22,42.
J 9	D: 25
J 56	D: 15b
J 9,J 56	D: 15a

3.3.2. ESSEN-Stämme

Ein diffundierendes Bakteriozin war bei E 12 mit den Indikatoren J 52,J 55,J 56 erkennbar. Mit den übrigen Indikatoren aus dem Gesamtspektrum - J 9,J 10,J 38,J 87,D 35,D 37,D 38, D 40a,D 40b,M 11,M 116,M 199 - war keine diffundible Hemmsubstanz nachweisbar.

3.3.3. HONGKONG-Stämme

Hier war ebenfalls nur bei einem Stamm, H 27b, eine Ausbreitung der Aktivität im Agar zu beobachten (Ind. J 10, J 38, J 67, M 199).

3.4. T r y p s i n empfindlichkeit

Als Kontrolle für Trypsinsensitivität wurde H 27b verwendet: von diesem Stamm war aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt, daß er einen trypsinsensitiven Hemmstoff ausscheidet. Mit Hilfe dieses Stammes mußte zunächst das Verfahren zum Nachweis der Trypsinsensitivität optimiert werden. Dabei zeigte sich nach Zugabe unterschiedlicher Trypsinkonzentrationen folgendes Bild:

Tab. 12 : Trypsinempfindlichkeit von H 27b

Trypsin (mcg/ml)	Bakteriozin nachweisbar
0	+
0,01	+
0,1	+
1,0	+
10,0	-

Da sich volle Inaktivierung der Hemmsubstanz von H 27b erst ab 10mcg Trypsin einstellte, unternahmen wir den gleichen Versuch, nun jedoch mit 10 mcg Trypsin/ml als niedrigster Konzentration beginnend:

Tab. 13: Trypsinempfindlichkeit von H 27b

Trypsin (mcg/ml)	Bakteriozin nachweisbar
0	+
10	-
25	-
50	-
100	-

Hierbei stellte sich eine von steigenden Trypsinmengen unabhängige, d.h. in allen Fällen vollständige, Inaktivierung heraus. Bei nachfolgenden Untersuchungen verwendeten wir deshalb 25 mcg/ml als Standardkonzentration, d.h. einen sicheren Überschuß an Enzym.

Bei Spontanproducern wurden zusätzlich Medien ohne Mitomycin und Trypsin mitgeführt; hingegen legten wir bei Producern, die Indikatoren erst nach Mitomycininduktion hemmten, lediglich je eine Platte mit optimaler Induktions- und Trypsinkonzentration an.

Unter Trypsineinwirkung blieb die Hemmwirkung bei 5 von 47 Producern (= 10%) aus (s. Tab. 14):

Tab. 14 : Trypsinempfindliche Hemmsubstanzen

Mitomycin und Trypsin (mcg/ml)

Producer	0	25 Tryp.	0,15 Mito.	0,15 Mito. + 0,25 Tryp.	sensitive Stämme
E: 7		keine	+/-	-	J 9
E: 12		Spontan-	+	-	J 55, J 56
E: 12		synthese	+	+/-	J 52
H: 27a		+ -	+	-	M 199
H: 27b		+ -	+	-	J 10, J 38, J 52, J 55, J 67, J 87, D 34, M 199
D: 24		keine Spontan- synthese	+	+/-	J 9

3.5. Filter durchgängigkeit

Zur weiteren Charakterisierung der von uns gefundenen Bakteriozine war zu untersuchen, ob eine Differenzierung in membrandurchgängige und membrangebundene möglich ist. Bei einer Reihe von Producern ließ sich tatsächlich eine Adsorption von Hemmstoffen an die Filtermembran feststellen. Dabei kam es zu folgenden Veränderungen der Hemmspektren:

Tab. 15 : Hemmspektren und Membrandurchgängigkeit
von Bakteriozinen
Mitomycin (mcg/ml)

Producer	0	0 + Filt.	0,15	0,15 + Filt.	0,25	0,25 + Filt.	sensitive Stämme
D: 2b	keine Spontansyn-				+	+/-	M 116
D: 2b	these				+	-	M 11
D: 3	+ -		+	-			J 38
D: 6	+/- -				+	-	J 9
D: 10	keine		+/-	-			D 40a
D: 14	Spontansyn- these		+	-			D 40a
D: 15b	+ -		+	-			J 9
D: 24	keine				+	-	J 9
D: 26a	Spontan- syn-				+	-	J 10, M 11, M 116
D: 32	these		+	+/-			J 9
D: 34			+/-	-			D 40b
D: 41					+/-	-	J 9
D: 43	+ -				+	-	J 56, D 40b
E: 12	+/- -		+	+/-			M 11, M 116

IV. DISKUSSION

123 aus klinischem Untersuchungsmaterial in Denver, Essen und Hongkong isolierte Stämme wurden auf Wachstumshemmung gegenüber Stämmen derselben Spezies getestet. Ziel war einmal das Auffinden weiterer Hemmsubstanzen um das in einer vorangegangenen Arbeit (13) erstellte Typisierungsschema nach Bakteriozinen auszubauen. Weiterhin sollten neu gefundene Hemmstoffe charakterisiert werden nach der Art ihrer Synthese (spontan oder mitomycininduziert), ihrem Diffusionsvermögen, ihrer Trypsinempfindlichkeit sowie nach Adsorption an Celluloseacetatmembranen.

1. Häufigkeit und Synthesebedingungen bakteriozinogener Stämme

Innerhalb der drei Stammgruppen geographisch verschiedener Herkunft konnte Bakteriozinogenie bei 47 von 123 Stämmen (= 38,2%) nachgewiesen werden:

Mit Abstand am häufigsten unter den Isolierungen aus Denver (D-) mit 40 unter 48 Stämmen (= 83,3%). Aus der Essen- (E-) Sammlung unter 3 von 20 Stämmen (= 15%). Aus der Hongkong- (H-) Gruppe bei 4 unter 35 Stämmen (= 11,4%).

Vergleicht man die 47 Producerstämme nach den Bedingungen, unter denen sie eine Hemmwirkung ausprägten, so wird deutlich, daß hier erst malig bei *Proteus rettgeri* (13) Stoffe mit Bakteriozin charakter bereits ohne Induktion mit Mitomycin nachgewiesen werden konnten (wie etwa bei der Mehrzahl der Isolierungen von *Pseudomonas*

aeruginosa). Diese Spontansynthese von Hemmsubstanzen war bei 22 und damit 47% aller Producer (Denver 47,5%, Essen 33,3%, Hongkong 50%) gegeben.

Für die übrigen 25 bakteriozinogenen Stämme mußte die Hemmstoffsynthese induziert werden.

Die Gegenwart des Mitomycins zeigt auch bei spontan bakteriozinogenen Stämmen Wirkung: durch Induktion verbreitert sich bei einigen unter ihnen das Wirkungsspektrum. So bei D 10, D 14 und D 20 um den Indikator D 40a, bei D 28 um die sensitiven Stämme M 11 und J 9, bei E 12 um die Indikatoren J 52, J 55, J 56, D 35, D 38, D 40a, D 40b.

Die Deutung dieser breiteren Aktivität ist komplex. Zunächst kann an einen rein quantitativen Effekt gedacht werden: unter Induktion verstärkte Synthese und damit erhöhte Konzentration des bereits spontan gebildeten Bakteriozins. Dadurch war Hemmwirkung auch bei relativ wenig sensitiven Stämmen erkennbar. Damit läßt sich aber nicht befriedigend erklären, wieso dieses Phänomen nur bei e i n i g e n der Spontanproducer auftritt. Weiterhin bleibt unverstanden, weshalb bei einem der Producer mit induktiv verbreitertem Spektrum, nämlich bei E 12, unverhältnismäßig viele, insgesamt 7, neue Indikatoren hinzukommen. Rein quantitative Ursachen scheinen nicht hinreichend. Dies führt zur Hypothese qualitativer Unterschiede an Bakteriozin mit und ohne Induktion als Ursache für die Spektrumserweiterung, zumindest für den Producer E 12.

2. Klassifizierung der Hemmsubstanzen

2.1. Nach Hemmspektren

Am bedeutsamsten für die Charakterisierung von Hemmstoffen mit Bakteriozincharakter ist ohne Zweifel die Abgrenzung nach biologischer Wirkung, d.h. nach Spezifität ihres Hemmspektrums. Auf diese Weise ließen sich unter den Producerstämmen aus Denver 14 (vgl. Tab.7), denen aus Essen sowie aus Hongkong jeweils 3 verschiedene Producertypen - insgesamt also 20 Producer spezifischen Hemmspektrums - nachweisen. Auffallend ist dabei, daß ein hemmspektrumgleicher Producertyp in allen drei Stammgruppen auftritt. Sein Bakteriozin ist wirksam nur gegen den Indikator J9.

2.2. Nach Diffusion

Mit der Ausstreichmethode war bei einer Reihe von Producern eine Hemmung der Indikatoren auch außerhalb der zentralen Kreisfläche vorangegangenen Producerwachstums beobachtet worden. Diese Ausbreitung der Wirksubstanz zeigte sich bei 17 unter 47 Proteusstämmen (= 36,2%), wovon 15 aus Denver und je einer aus Essen (E 12) und Hongkong (H 27b) stammten.

Neben Hinweisen auf die Molekülgröße der jeweiligen Hemmsubstanz, ermöglichte die beobachtete Diffusion in einigen Fällen die Annahme, daß von ein- und demselben Stamm mehr als nur ein Hemmstoff abgegeben wurde: Mit Ausnahme der Stämme D 22, D 25 und D 42, waren nämlich alle anderen oben aufgeführten in der Lage, unterschiedliche Indikatoren entweder innerhalb oder außerhalb der Zone vorangegangenen Producerwachstums zu hemmen. Dies deutet darauf

hin, daß hier je z w e i Hemmsubstanzen, eine diffundierende und eine nicht diffundierende synthetisiert worden waren.

2.3. Nach Trypsinempfindlichkeit

Trypsin war für unsere Untersuchungen deshalb von Interesse, da bekannt ist, daß vor allem niedermolekulare Bakteriozine durch proteolytische Enzyme wie Trypsin und Pepsin sowie bakterielle Proteasen inaktiviert werden (6).

Einige der in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen Hemmstoffe v e r l o r e n ihre Hemmwirkung gegenüber a l l e n Indikatoren in Gegenwart von jeweils 25 mcg Trypsin/ml. Dies war der Fall bei den Producern E 7, H 27a, H 27b sowie D 24 (vgl. Tab. 14).

Beim Bakteriozin des Producers E 12 hingegen verengte sich in trypsinhaltigem Medium das Indikatorspektrum lediglich um drei Indikatoren. Offenbar werden hier gleichzeitig z w e i Hemmstoffe, ein trypsin e m p f i n d l i c h e r sowie ein trypsin w i d e r s t ä n d i g e r, synthetisiert, letzterer wirksam bei 12 Stämmen, ersterer bei drei anderen Indikatorstämmen (J 52, J 55, J 56). Dabei fällt ein Zusammenhang zwischen Trypsinsensitivität und Diffusionsfähigkeit auf: der sich im Agar ausbreitende Hemmstoff ist bei E 12 offenbar identisch mit dem trypsinsensitiven.

Bei der Hemmsubstanz des H 27b besteht dieser Zusammenhang nicht: Hier war Diffusion gegen 4 Indikatoren festzustellen, n a c h Trypsinzusatz blieb die Hemmwirkung jedoch gegenüber insgesamt 8 - und somit gegen alle ursprünglichen Indikator-

stämme - aus. Demnach sollten hier zweierlei trypsin-sensitive Bakteriozine, ein diffundierendes und ein stationäres vorliegen.

2.4. Nach Filterdurchgängigkeit

Wie im Ergebnisteil (Tab. 15) dargestellt, konnten die Hemmstoffe von 6 Stämmen (= 12,8%) das Celluloseacetatfilter n i c h t passieren.

Anders verhielten sich sieben weitere Producer (D 3, D 10, D 14, D 15b, D 34, D 41 und E 12, = 14,9%): bei ihnen unterschied sich das Indikatorspektrum ihrer Hemmstoffe m i t Filter von dem Spektrum o h n e Filter. So verloren die Bakteriozine der Stämme D 3, D 10, D 14, D 15b, D 34 und D 41 j e e i n e m , E 12 z w e i Indikatoren gegenüber ihre Hemmwirkung.

Das völlige Ausbleiben der Wachstumshemmung eines Teils der Indikatoren im jeweiligen Spektrum deutet darauf hin, daß vom jeweiligen Producer z w e i e r - l e i Hemmsubstanzen, ein membran a d s o r b i e r - t e r und ein membran p e r m e a b l e r ausgeschieden werden.

Der Nachweis von gleichzeitig z w e i Hemmstoffen u n t e r s c h i e d l i c h e n Adsorptionsverhaltens bei e i n e m Producer steht im Gegensatz zu den Ergebnissen GOVANS, der unter Anwendung der gleichen Methode bei Pyocinen (11,12) entweder nur durchgängige o d e r nur impermeable Substanzen fand.

Tab. 16 : Klassifizierung der gefundenen Hemmstoffe

Pro- ducer	Hemmstoff- merkmale	I n d i k a t o r s p e k t r u m		Hemmstoff- klassen
D: 1, 17, 26b, 30, 31	induziert	M 11	M 116	induziert
D: 2b	induziert	M 11	M 116	induziert +
	adsorbiert	M 11	M 116	adsorbiert +
D: 2a, 33	induziert		M 116	induziert 43
D: 26a	induziert	M 11	M 116 J 10	induziert +
	adsorbiert	M 11	M 116 J 10	adsorbiert
D: 27, 35, 37, 39	induziert	M 11		induziert
H: 27a	spontan		M 199	spontan +
	tryps.-sens.			trypsin-sens.
D: 28	induziert	M 11	J 9 J 87	1. induziert
	spontan	-	- J 87	2. spontan
D: 4, 7, 11, 12, 16, 19, 23	spontan		J 38 D 40b	1. spontan
	diffundiert.		J 38 -	2. spontan +
				diffundiert.
D: 34	induziert		J 38 D 40b	1. induziert
	adsorbiert		- D 40b	2. induziert +
				adsorbiert

Pro- ducer	Hemmstoff- merkmale	I n d i k a t o r s p e k t r u m			Hemmstoff- klassen
D: 3	spontan	J 38	D 40b		1. spontan
	diffundier.	J 38	-		2. spontan +
	adsorbiert	J 38	-		diffundier. + adsorbiert
D: 22,42	spontan	J 38	D 40b		spontan +
	diffundier.	J 38	D 40b		diffundierend
	induziert	J 38	D 40b	D 40a	1. induziert
D: 10	spontan	J 38	D 40b	-	2. spontan
	adsorbiert	-	-	D 40a	3. induz. + ads.
D: 14	induziert	J 38	D 40b	D 40a	1. induziert
	spontan	J 38	D 40b	-	2. spontan
	diffundier.	J 38	-	-	3. spontan +
	adsorbiert	-	-	D 40a	diffundier.
D: 20	induziert	J 38	D 40b	D 40a	1. induziert
	spontan	J 38	D 40b	-	2. spontan
	diffundier.	J 38	-	-	3. spontan +

Pro- ducer	Hemmstoff- merkmale	I n d i k a t o r s p e k t r u m	Hemmstoff- klassen
D: 21; H: 9,24	induziert	J 9	induziert
D: 25	spontan diffundier.	J 9 J 9	spontan + diffundier.
D: 6	spontan adsorbiert	J 9 J 9	spontan + adsorbiert
D: 32	induziert adsorbiert	J 9 J 9	induziert + adsorbiert
D: 24	induziert adsorbiert tryps.-sens.	J 9 J 9 J 9	induziert + adsorbiert + trypsin-sens.
E:7	induziert tryps.-sens.	J 9 J 9	induziert + trypsin-sens.
D: 41	induziert adsorbiert	J 9 J 9	1. induziert 2. induziert + adsorbiert
D: 43	spontan adsorbiert	J 56 D 40b J 56 D 40b	spontan + adsorbiert

I n d i k a t o r s p e k t r u m

Pro-ducer	Hemm-stoff-merk-	male		Hemm-stoff- klassen
E: 18	indu.	J 38 D 38		induz.
D: 29	indu.	J87		induz.
D: 40a	induz.	D 38 D 36 D 37 D 39		induz.
D: 8b	induz.	D 38 D 37		induz.
D: 15a	spon. diff.	J 9 J 87 J 10 J 56 D 34 M 11 M 116 J 9 - - J 56 - -		1. spon. 2. spon. + diff.
D: 15b	spon. diff.	J 9 J 87 J 10 J 56 D 34 M 11 M 116 - - - J 56 - -		1. spon. 2. spon. + diff.
	ads.	J 9 - - - -		3. spon. + ads.
H: 27b	spon. diff. try.-	J 10 J 38 J 52 J 55 J 67 J 87 D 34 M 199 J 10 J 38 - - J 67 - - M 199 J 10 J 38 J 52 J 55 J 67 J 87 D 34 M 199		1. spon. + diff. 2. spon. + tryps.
	sen.			sen

Pro-ducer	Hemm-stoff-merk-male	I n d i k a t o r s p e k t r u m																Hemm-stoff-klassen
E: 12	indu.	J 9	J 10	J 38	J 52	J 55	J 56	J 87	D 35	D 37	D 38	D 40a	D 40b	M 11	M 116	M 199	1. induz.	
	spon.	J 9	J 10	J 38	-	-	-	J 87	-	D 37	-	-	-	M 11	M 116	M 199	2. spont.	
	diff.	-	-	-	J 52	J 55	J 56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3. induz.	
																	+ diff.	
	try.-s.	-	-	-	J 52	J 55	J 56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ try.-sen	
	ads.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M 11	M 116	-	4. induz.	
																	+ adsorb.	

2.5. Mit Hilfe aller Kriterien

Geht man davon aus, daß sämtliche Eigenschaften, welche hier zur Charakterisierung der gefundenen Hemmstoffe dienten, voneinander unabhängig sind, dann lassen sich auf diese Weise 49 (Tab. 16) Hemmstoffklassen abgrenzen: Keines der verwendeten Merkmale - Spontan- oder Induktionssynthese, Diffusion im Agar, Trypsinsensitivität, Membranadsorption - tritt immer zugleich mit einem zweiten auf. Damit erscheinen sie als unabhängig voneinander, ihre Verwendung zur Klassifizierung ist mithin gerechtfertigt. Besondere Erwähnung verdient die Vielfalt von Hemmstoffen innerhalb dieser relativ kleinen Zahl (123) an untersuchten Stämmen. Dafür verantwortlich ist die Tatsache, daß von einer Reihe von Stämmen mehr als ein Hemmstofftyp abgegeben wurde:

1) Producer mit z w e i Hemmstofftypen:

D 3, D 4, D 7, D 11, D 12, D 15a, D 16, D 19, D 23,
D 28, D 34, D 41.
E 27b.

2) Producer mit d r e i Hemmstofftypen:

D 10, D 15b, D 20.

3) Producer mit v i e r Hemmstofftypen:

D 14.
E 12.

Epidemiologische Bezüge

Lediglich bei den Stämmen aus Denver sind Angaben über Untersuchungsmaterial, den Tag der Probeentnahme sowie Namen der Patienten bekannt. Bei ihnen wurden so epidemiologische Rückschlüsse möglich. Sie sollen hier diskutiert werden:

Nach Natur des Probenmaterials getrennt, ergibt sich folgende Verteilung der bakteriozinogenen Stämme:

- a) BLUT: D 13 (Non-Producer)
- b) RACHENABSTRICH: D 14 - hemmt J 38 und D 40b spontan, unter Induktion erweitert sich das Spektrum um den Indikator D 40a.
- c) WUNDABSTRICH: D 33 - hemmt mitomycininduziert M 116; D 42 - hemmt J 38 und D 40b spontan; unter Induktion verändert sich die Breite des Spektrums nicht.
- d) SPUTUM: D 3, D 4, D 7, D 10, D 11, D 22.
Die aus diesem Material isolierten bakteriozinogenen Stämme weisen ein gemeinsames Hemmspektrum auf (J 38, D 40b; bei D 10 zusätzlich D 40a). Zur Synthese der Hemmstoffe ist bei keinem dieser Stämme Mitomycininduktion erforderlich. Eine Überprüfung auf mögliche Identität muß, auf Grund gleicher Spektren, daher vorgenommen werden.
- e) URIN: D 1, D 2a, D 2b, D 5, D 6, D 8a, D 8b, D 9, D 12, D 15a, D 15b, D 16, D 17, D 18, D 19, D 20, D 21, D 23, D 24, D 25, D 26a, D 26b, D 27, D 28, D 29, D 30, D 31, D 32, D 34, D 35, D 36, D 37, D 38, D 39, D 40a, D 40b, D 41, D 43.

Die größte Zahl der Stämme stammt aus Urinproben. Darunter zeigten sieben Stämme keine Anzeichen einer Hemmstoffsynthese (D 5, D 8a, D 9, D 18, D 36, D 38, D 40a).

Alle übrigen Stämme synthetisierten Bakteriozine. Produ cereigenschaften waren bei 31 (31/38 = 82%) der aus Urin isolierten Stämme mit insgesamt 14 unterschiedlichen Indikatorspektren zu beobachten. Von besonderem Interesse sind Producer mit identischem Wirkungsspektrum. Bei ihnen liegt der Verdacht nahe, daß die zu einer Gruppe zusammengefaßten in Wirklichkeit Kopien ein- und desselben Stammes sein könnten. Dann sollten diese Stämme jedoch auch im Antibiotogramm sowie den biochemischen Leistungen identisch sein.

Dieses Problem stellt sich jeweils innerhalb der folgenden Producergruppen (ausgewählt nach Tab. 16):

1. H 9, H 24 (Untersuchungsmaterial unbekannt)

Diese beiden Stämme gleichen Bakteriozintyps weichen im Antibiotogramm (H 9 resistent, H 24 sensitiv gegenüber Sulfanilamid; vgl. Tab. 2 : Resistenzmuster) voneinander ab, können folglich nicht als Kopien angesehen werden.

2. D 4(S), D 7(S), D 11(S), D 12(U), D 16(U), D 19(U), D 23(U)

U = aus Urin isoliert

S = aus Sputum isoliert

A = Mundabstrich

Die Stämme stimmen in ihren biochemischen Leistungen überein.

Differenzierung nach Resistenzverhalten (vgl. Tab. 2):

	NX	KANA/NEO
D 4	2	2
D 7	1	2
D 11	1	1
D 12	2	2
D 16	1	2
D 19	1	2
D 23	1	2

Hier liegen demnach drei verschiedene Stammgruppen vor:
D 4 und D 12; D 11; D 7, D 16, D 19 und D 23.

3. D 22(S), D 42(A)

Die beiden Stämme können als identisch gelten, da sie sowohl im Bio- als auch im Resistenztyp übereinstimmen.

4. D 1, D 17, D 26b, D 30, D 31 (alle aus Urin isoliert)

Differenzierung

a) nach Biotypen:

D 17, D 26b, D 30, D 31: unbeweglich.

D 1, D 26b, D 30 : fermentieren Mannit nicht.

b) nach Resistenztypen:

Nur D 1 cephalothinsensitiv (vgl. Tab. 2).

Demnach muß D 1 als selbständiger Stamm gelten.

Um identische Stämme handelt es sich hingegen sowohl bei D 17 und D 31 als auch bei D 26b und D 30.

5. D 2a(U), D 33(A)

Die Stämme weichen sowohl in der Biochemie als auch im Antibiotogramm voneinander ab:

Differenzierung

a) nach Biotypen:

D 2a: keine Indolbildung.

b) nach Resistenzverhalten (vgl. Tab. 2):

	ANA	AMPI	CEPH
D 2a	1	1	1
D 33	2	2	2

Folglich sind diese Stämme als zwei eigenständige anzusehen.

6. D 27, D 35, D 37, D 39 (alle aus Urin isoliert)

Im Antibioogramm war volle Übereinstimmung zu beobachten (vgl. Tab. 2), Abweichungen traten im Fermentationstyp auf (nur D 37 und D 39 fermentieren Mannit). Als Kopien wären demnach D 27 und D 35 bzw. D 37 und D 39 zusammenzufassen.

Nach diesen Ergebnissen muß angenommen werden, daß folgende Stämme - obwohl von verschiedenen Patienten aus unterschiedlichen Materialien isoliert - tatsächlich identisch sind:

- a) D 7(S), D 16(U), D 19(U), D 23(U);
- b) D 4(S), D 12(U);
- c) D 22(S), D 42(A);
- d) D 17(U), D 31(U);
- e) D 26b(U), D 30(U);
- f) D 27(U), D 35(U);
- g) D 37(U), D 39(U).

An diesen Fällen läßt sich eindrucksvoll die praktische Bedeutung der hier erarbeiteten Möglichkeiten einer Bakteriozintypie bei Infektionen mit *Proteus rettgeri* demonstrieren. Mit dieser Methode der epidemiologischen Ferntypisierung wird beweisbar, daß identische Erreger bei verschiedenen Patienten auftauchen. Einmal bei gleichartigen Infektionen (Stammpaar d mit g), zum anderen aber auch bei so unterschiedlichen Materialien wie Urin, Sputum, Abstrichen und zwar wiederum bei verschiedenen Patienten (a, b, c). Demnach muß eine bemerkenswert weite Streuung dieser vielfach resistenten Erreger (vgl. Tab. 2) in den betreffenden Bereichen eingetreten sein. Ein eindrucksvolles Beispiel nosokomialer Infektionen.

Die Leistungsfähigkeit unserer Bakteriozinotypie wird besonders deutlich an zwei Stämmen, D 24 und D 25.

Sie wurden an einem Tag von demselben Patienten aus dem gleichen Untersuchungsmaterial - Urin - isoliert. Bei ihnen ließen sich zwei unterschiedliche Bakteriozintypen nachweisen, von uns als Hinweis dafür gewertet, daß hier eine echte Mischinfektion vorliegt. Die Richtigkeit dieser Annahme ließ sich dann erhärten durch e i n e Abweichung im Antibiotogramm:

die MHK für Carbenicillin lag bei D 25 bei 10.000 mcg/ml, bei D 24 bei 10 mcg/ml.

Es soll nicht versäumt werden, abschließend zu unterstreichen, daß Übereinstimmung von Stämmen aus abgegrenzten Klinikbereichen in herkömmlichen mikrobiologischen Kriterien eine scheinbare Identität vortäuschen kann und somit zu einer hospitalhygienisch völlig unqualifizierten Charakterisierung als kreuzinfizierende Stämme führt. Erst die Erschließung und der Einsatz exakter Ferntypisierungsmethoden ist als mikrobiologischer Beitrag zur Eindämmung von Hospitalinfektionen zu werten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

123 Stämme der Spezies *Proteus rettgeri* aus verschiedenen geographischen Regionen (Denver, Essen, Hongkong), wurden auf die Fähigkeit zur Synthese antibakterieller Hemmstoffe hin untersucht. Darunter waren 47 Stämme in der Lage, andere Stämme der gleichen Spezies in ihrem Wachstum zu hemmen.

Eine Klassifizierung der Substanzen konnte vorgenommen werden anhand biochemischer sowie physikochemischer Merkmale. Dabei ließen sich 49 verschiedene Hemmstofftypen abgrenzen. Bei einigen Stämmen traten gleichzeitig mehrere Hemmstofftypen auf.

Erstmalig konnten in dieser Arbeit bei *Proteus rettgeri* spontan synthetisierte Hemmstoffe nachgewiesen werden. Weiterhin gelang es, bisher bei dieser Spezies nicht beobachtete niedermolekulare Bakteriozine zu finden. An einigen Beispielen konnte die epidemiologische Bedeutung der Bakteriozinogenie bei *Proteus rettgeri* aufgezeigt werden.

VI. LITERATUR

- 1) BAUERNFEIND, A.: Kreuzinfektion der Harnwege durch einen neuen Typ von *Proteus rettgeri*.
Habil.-Schrift an der Mediz. Fak. der
Ludw.-Maxim.-Univ., München (1973)
- 2) BAUERNFEIND, A.: Harnwegsinfektionen durch *Proteus rettgeri*. Fortschr. Medizin 91, 588 (1973)
- 3) BAUERNFEIND, A., HAUPT, S.: Erregerspektrum bei Bakteriurien männlicher und weiblicher erwachsener Patienten.
Urologe, Ausgabe A 11, 90 - 94 (1972)
- 4) BAUERNFEIND, A., PETERMÜLLER, C., BURROWS, J.R.: Standardization of Pyocin Typing (1977)
- in Vorbereitung -
- 5) BRADLEY, D.E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev. 31, 230 - 314 (1967)
- 6) BRANDIS, H.: Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. Fischer Verlag (1971)
- 7) BROCK, T.D., PEACHER, B., PIERSON, D.: Survey of the bacteriocins of Enterococci.
J. Bact. 86, 702 - 707 (1963)
- 8) DIMITRACOPOULOS, G.: Bacteriocinogenie in *Proteus* Spezies. Zbl. Orig. A 222, 227 (1972)
- 9) EDWARDS, P.R., EMMING, J.H.: Identification of Enterobacteriaceae. 3rd Edition, Burgess Publishing Comp., 324 - 330 (1972)
- 10) GILLIES, R.R., GOVAN, J.R.W.: Typing of *Pseudomonas* Pyocyanea by Pyocine Production.
J. Path. Bact. 91, 339 - 345 (1966)
- 11) GOVAN, J.R.W.: Studies on the Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: Production of Contractile and Flexuous Pyocins in *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Gen. Microb. 80, 17 - 30 (1974)

- 12) GOVAN, J.R.W.: Studies on the Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: Morphology and Mode of Action of Contractile Pyocins.
J.Gen.Microb. 80, 1 - 15 (1974)
- 13) HELLINGER, B.: Ein neuer Weg für die epidemiologische Differenzierung von *Proteus rettgeri*.
Inauguraldissertation der Ludw.-Maxim.-Univ. München (1977)
- 14) IVANOVICS, G.: Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bact. Rev. 26, 108 (1962)
- 15) REEVES, P.: The bacteriocins.
Bact. Rev. 29, 46 - 59 (1965)

Danksagungen

Herrn Professor Dr. Dr. H. Eyer, Vorstand des Max-von-Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie München, danke ich sehr dafür, daß er mir das Arbeiten an seinem Institut ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. A. Bauernfeind, Privatdozent der Universität München, für die freundliche Überlassung des Themas, seine fachliche Beratung sowie die gegebenen Anregungen.

Erwähnt seien hier ebenfalls die Laborassistentinnen Frau Christl Petermüller sowie Miss Jill Burrows, die stets geduldig die technischen Anleitungen bei meiner Arbeit übernahmen.

Lebenslauf

Geburtsort	
und -tag	23.4.1948, Speyer
Eltern	Oberst a.D. Max Cammisar Herta Cammisar, geb. Mack
Schulausbil- dung	
1954 bis 1959	Volksschule, Speyer
1959 bis 1968	Mathem.-Naturw.Gymnasium, Speyer
Sonstige Aus- bildung	
1968 bis 1970	Praktikum in einer Apotheke
1970	Pharmazeutisches Vorexamen
1970 bis 1971	Pharmazeutische Tätigkeit
1971/72	Chemiestudium, Mainz
Medizinstudium	
1972	Studienbeginn an der Ludwig- Maxim.-Univ., München
1975	Physikum
1976	1. Teil der Ärztl. Prüfung
1976 bis 1977	Doktorarbeit am Max-von-Petten- kofer-Institut
1978	2. Teil der Ärztl. Prüfung
1978 bis 1979	Praktisches Jahr
19. Nov. 1979	Abschluß des Medizinstudiums mit dem 3. Teil der Ärztl. Prüfung

